

PRODUCTION OF L-TRYPTOPHAN

[71] **Applicant:** MITSUBISHI CHEM

[72] **Inventors:** HATAKEYAMA KAZUHISA;
GOTO MAKOTO;
TERASAWA MASATO;
YUGAWA HIDEAKI

[21] **Application No.:** JP07181730

[No drawing]

[22] **Filed:** 19950718

[43] **Published:** 19970204

[Go to Fulltext](#)

[57] Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To inexpensively obtain t-tryptophan in a high efficiency.
SOLUTION: The objective L-tryptophan is successively generated in a reacting solution with keeping pH of the reacting solution at 9-10 and controlling a concentration of generated L- serine in the reacting solution to $\leq 50\text{mM}$ in generating L-tryptophan from glycine, formaldehyde and indole in the co- presence of a microorganism fungus containing serine hydroxymethyl transferase or its treated substance and a microorganism fungus containing tryptophan synthase or tryptophanase or its treated substance.

[51] **Int'l Class:** C12P01322 C12N00121 C12N00910 C12N01509
C12N00910 C12R00119

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-28391

(43)公開日 平成9年(1997)2月4日

(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 P 13/22			C 12 P 13/22	
// C 12 N 1/21		7804-4B	C 12 N 1/21	
9/10			9/10	
15/09	Z N A	9162-4B	15/00	Z N A A
(C 12 N 9/10				

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-181730	(71)出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成7年(1995)7月18日	(72)発明者	島山 和久 茨城県稟敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	後藤 誠 茨城県稟敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	寺沢 真人 茨城県稟敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 晓司 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L-トリプトファンの製造法

(57)【要約】

【構成】 セリンヒドロキシメルトランスフェラーゼを含有する微生物菌体又はその処理物とトリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼを含有する微生物菌体又はその処理物との共存下に、グリシン、ホルムアルデヒド及びインドールからL-トリプトファンを生成せしめるに際し、反応液中のpHを9~10に維持し、反応液中の生成L-セリン濃度を50mM以下に制御しながらL-トリプトファンを反応液中に連続的に生成せしめることを特徴とするL-トリプトファンの製造方法。

【効果】 本発明の製造方法により、L-トリプトファンを高効率で安価に製造することが可能になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物菌体又はその処理物とトリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼを含有する微生物菌体又はその処理物との共存下に、グリシン、ホルムアルデヒド及びインドールからL-トリプトファンを生成せしめ、反応液よりL-トリプトファンを採取する製造方法。

【請求項2】 反応液中のpHを9~10に維持し、反応液中の生成L-セリン濃度を50mM以下に制御しながらL-トリプトファンを反応液中に連続的に生成せしめることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、L-トリプトファンの製造法に関し、更に詳しくは、原料としてインドール、グリシンおよびホルムアルデヒドを用い、トリプトファンシンターゼとセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの共存下酵素反応を行いL-トリプトファンを生成蓄積せしめる、L-トリプトファンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、L-トリプトファンの酵素的な合成は、トリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼの存在下にインドールとL-セリンを反応させて行なわれている(特公平5-79311、特開平1-51093等)。しかしながら、L-セリンは比較的高価であることから、L-セリン以外の原料を使う方法が検討されている。インドール、グリシンおよびホルムアルデヒドからのL-トリプトファン製造法に関して、酵素反応の第1段階でセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの作用でグリシンとホルムアルデヒドからL-セリンを製造し、次いで第2段階で反応系へインドールを添加し製造する方法が提案されている(特開昭62-502934)。

【0003】 しかしながら上記の方法では、反応を2段階に別ける為、操作が繁雑であり、製造も回分式に限定されるので決して工業的に有利な方法とは言い難い。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 前述の如く、インドール、グリシンおよびホルムアルデヒドを原料とするL-トリプトファン製造法では工業的に有利な方法は提案されていない。本発明は、上記問題を解決し、従来に比べて効率的かつ安価なL-トリプトファンの製造方法を提供すべくなされたものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物菌体又はその処理物とトリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼを含有する微生物菌体又はその処理物との共存下

に、インドール、グリシン及びホルムアルデヒドからL-トリプトファンを連続式に効率良くL-トリプトファンを反応液中に生成蓄積せしめ得ることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 すなわち、本発明はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物菌体又はその処理物とトリプトファンシンターゼ又はトリプトファナーゼを含有する微生物菌体又はその処理物との共存下に、グリシン、ホルムアルデヒド及びインドールからL-トリプトファンを生成せしめ、反応液よりL-トリプトファンを採取する方法を提供するものである。

【0007】 さらに、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられるトリプトファンシンターゼを含有する微生物としてはインドールとL-セリンからL-トリプトファンを生成し得る能力を有する微生物であれば特に限定されるものではなく、例えば、エシェリヒア・コリK-12 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリK-12 YK2004 (FERM BP-1732)、エシェリヒア・コリK-12 YK2009 (FERM BP-3244)、バチルス・ズブチリス (Henner, D. J. et al. (1984) Gene, vol. 34, 169~177) ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Matsui et al. (1986) Agric. Biol. Chem., Vol. 51, 823~828)、サルモネラ・チフィムリム (Kawasaki, H. et al. (1987) J. Biol. Chem., Vol. 267, 10678~10683)、バチルス・ステアロサモフィラスIFO13737、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-149-7) 等が挙げられる。好ましくは、エシェリヒア・コリK-12 YK2009 (FERM BP-3244) が挙げられる。

【0008】 また、トリプトファナーゼを含有する微生物としては、インドールとL-セリンからL-トリプトファンを生成し得る能力を有する微生物であれば特に限定されるものではなく、例えば、エシェリヒア・コリATCC 25019、エシェリヒア・コリIFO3301、エシェリヒア・コリK-12 YK3002 (FERM BP-1733)、エシェリヒア・コリK-12 YK3003 (FERM BP-1734)、エシェリヒア・コリK-12 YK3005 (FERM BP-1736)、シンビオバクテリウム・サモフィラム (Suzuki, S. et al. (1988) J. Gen. Microbiol. 134, 2353) 等が挙げられる。好ましくは、エシェリヒア・コリK-12 YK3005 (FERM BP-1736) が挙げられる。

【0009】 さらに、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物としては、グリシンとホルムアルデヒドからL-セリンを生成し得る能力を有する微生物であれば特に限定されるものではなく、例えば、エシェリヒア・コリK-12 (ATCC 2732)

5)、エシェリヒア・コリ MT-10350 (FERM P-7437, FERM BP-793)、エシェリヒア・コリ MT-10351 (FERM P-7438, FERM BP-794)、ハイホミクロビウム・メチロボラム (*Hyphomicrobium methylbororum*) GM 2 (特開平6-181776)、ハイホミクロビウム・SP (*Hyphomicrobium SP*) (FERM-P2236)、コリネバクテリウム・グリシノフィラム (*Corynebacterium glycinophilum*) ATCC 21341、コリネバクテリウム・グリシノフィラム (*Corynebacterium glycinophilum*) AJ 3414 (FERM P-1687)、コリネバクテリウム・グリシノフィラム (*Corynebacterium glycinophilum*) AJ 12401 (FERM P-11606)、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 等が挙げられる。好ましくは、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) が挙げられる。また、これらの菌株のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をエシェリヒア・コリ K-12 (ATCC 27325)、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497)、バチルス・サチルス (Chang, S. and Cohen, S. N. *Molec. Genet.*, 168, 111(1979)) 等の菌株に組換えた微生物等も、好適に使用できる (特開平2-42994、特開平6-181776等)。

【0010】セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、トリプトファンシンターゼ、あるいは、トリプトファンアーゼを含有する微生物の培養は、それ自体既知の通常用いられる、炭素源、窒素源、無機塩等を含む培地で行うことができる。炭素源としては、例えばグルコース、グリセロール、フラクトース、シクロロース、瓈糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムがそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にベプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイブリカ、カザミノ酸、ビオチン、チアミン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0011】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気的条件下に、培養温度は一般に20℃～50℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5～10、好ましくは7～8付近とことができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、特に制限するものではないが、通常1～10% (w/v)、更に好ましくは2～5% (w/v) である。また、培養期間は通常約5時間～約5日間である。

【0012】本発明の方法は、上記の如く培養して得た

培養物、該培養物を遠心分離法等により分離して得られる菌体または該菌体の処理物、例えば洗浄菌体、乾燥菌体、あるいはそれらの固定化物等の種々の形態が使用される。また、菌体破碎物、あるいはそれらを抽出・精製して得た酵素または該酵素を固定化した固定化酵素を使用してもよい。

【0013】かくして得られる、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物またはその処理物、および、トリプトファンシンターゼまたはトリプトファンアーゼを含有する微生物またはその処理物の混合物をインドールとグリシンおよびホルムアルデヒドを含有する水溶液中で酵素反応させて、反応液中にL-トリプトファンを生成蓄積せしめることができる。基質であるインドールの反応液中の濃度は、特に制限はないが、好ましくは0.5～2mMである。

【0014】グリシンの反応液中の濃度は、特に制限はないが、好ましくは、1mmol～10molである。ホルムアルデヒドの反応液中の濃度は、特に制限はないが、好ましくは、1mmol～10molである。L-セリンは反応液中のグリシンおよびホルムアルデヒドからセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼにより合成され、反応液中のL-セリン濃度は、液中のグリシンあるいはホルムアルデヒドの濃度あるいはセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの酵素量の調節により制御可能である。かくして決定されるL-セリンの反応液中の濃度は、20mM～50mM、好ましくは30mM～50mM、である。反応液には、基質であるインドール、グリシン、および、ホルムアルデヒドの他に、L-トリプトファンの生成率を高めるためにビリドキサルリシン (PLP)、テトラヒドロ葉酸 (THF)、および、塩化ナトリウムあるいは塩化カリウムを添加せしめることができる。

【0015】溶媒としては、一般には、水が用いられ、必要に応じてトリトンX-100 (ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル系非イオン性界面活性剤)、ツイーン20 (ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレイト系非イオン性界面活性剤) 等の界面活性剤を添加することもできる。反応液中のpHは、9～10であり、pHの調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。

【0016】反応温度は10～55℃、好ましくは、15～45℃である。上記の如く酵素反応させることによりL-トリプトファンを、高濃度で生成蓄積させることができる。さらに、本製造法は、該酵素や微生物を、膜を利用して系内に封じ込み、反応と同時に生成物を含有した透過液を抜き出し、菌体分離を連続的に行いL-トリプトファンを高濃度に効率よく連続製造することもできる。

【0017】得られたL-トリプトファンの分離・精製は、通常のイオン交換樹脂法、晶析法、その他の公知の

方法を組み合わせることにより、容易に行うことができる。

【0018】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、下記の実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げるものであり、これによって本発明の範囲は何ら限定されるものではない。

【0019】実施例1 セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼおよびトリプトファンシンターゼによるL-トリプトファン生成反応における、セリン濃度の影響
(1) プレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニング

(A) プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

プレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を、半合成培地であるA培地【組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20gを蒸留水に溶解して1リットルとする】1リットル中で対数増殖期後期まで培養した後に菌体を回収した。

【0020】得られた菌体をリゾチームを10mg/mlの濃度で含有する溶液【組成：10mM NaCl 、20mM トリス緩衝液 (pH 8.0)、1mM EDTA・2Na】15mlに懸濁した。該懸濁液にプロテナーゼKを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で添加し、これを37℃で1時間インキュベートした。次に、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間インキュベートして溶菌させた。得られた溶菌液に等量のフェノール／クロロホルム溶液を添加して室温で10分間穏やかに振盪した後、その全量を10～12℃で20分間、5,000×gの遠心分離に供し、その上清画分を分取した。該上清画分中に酢酸ナトリウムをその濃度が0.3Mとなるように添加し、次いで2倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒で掻き取り、これを70%エタノールで洗浄して風乾した。得られたDNAは、溶液【組成：10mM トリス緩衝液 (pH 7.5)、1mM EDTA・2Na】5mlを加えて4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0021】(B) セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片の調製

上記(A)項で調製したプレビバクテリウム・フラバムの染色体DNA 25 μg を、制限酵素EcoRI 50unitと37℃で1時間反応させて切断し、染色体DNAのEcoRI分解物を調製した。この分解物溶液

に、プラスミドpUC118 (宝酒造製) 1 μg を制限酵素EcoRIと37℃で1時間反応させて得た分解物溶液を混合し、これにそれぞれ最終濃度が50mMトリス緩衝液 (pH 7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 、およびT4DNAリガーゼ1unitとなるように各成分を添加し、16℃で15時間反応させて、DNA分解物を結合させた。

【0022】得られた溶液を用いて常法 [M. Mandel, A. Higa ; J. Mol. Biol.、53、159(1970)参照] に従ってグリシン要求性大腸菌変異株、エシエリヒア・コリAT2457 (g1yA) [静岡県三島市谷田1-111 国立遺伝学研究所遺伝実験生物保存研究センターに系統番号：ME5362として保管されており、同センターから入手可能] を形質転換し、得られた形質転換菌をアンピシリンを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む選択培地【組成： K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース2g、および寒天16gを蒸留水に溶解して1リットルとする】に塗抹した。選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有するL培地に植菌し、これを37℃で7時間培養した。培養液を4℃で10分間8,000×gの遠心分離にかけて菌体を回収した。回収した菌体からアルカリ-SDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning, p.90-91(1982)参照] によりプラスミドを抽出した。該プラスミドを制限酵素EcoRIで切断し、その切断断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、プラスミドpUC118のEcoRI部位に大きさ約3.8kbのDNA断片の挿入が認められた。

【0023】上記の大きさ約3.8kbの挿入DNA断片をアガロースゲル中より回収し、さらに制限酵素BamHIと制限酵素SmaIとで処理した。この分解物溶液と、プラスミドpUC119 (宝酒造製) を制限酵素BamHIと制限酵素SmaIとで処理して得た分解物溶液を混合し、pH 7.6で10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 の存在下、T4DNAリガーゼによりDNA分解物を結合させた。

【0024】得られた結合DNA溶液を用いて常法に従って、前記グリシン要求性大腸菌変異株エシエリヒア・コリAT2457を形質転換し、得られた形質転換菌をアンピシリンを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む前記選択培地に塗抹した。選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有するL培地【トリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム5gおよび寒天16gを蒸留水1リットルに溶解して調製】に植菌し、これを37℃で7時間培養した。培養液を4℃で10分間、8,000×gの遠心分離にて菌体を回収した。

【0025】回収した菌体から前記のアルカリ-SDS

法によりプラスミドを抽出し、該プラスミドを制限酵素 *Bam*H I と *Sma* I とで切断し、その切断断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、プラスミド *pUC119* の *Bam*H I - *Sma* I 部位に大きさ約 2. 1 kb の DNA 断片の挿入が認められた。そこで、本プラスミドを *pUC119-MJg1yA* と命名した。

【0026】(C) グリシン要求性大腸菌変異株への相補試験

上記 (B) 項で調製したプラスミド溶液を用いて前記グリシン要求性大腸菌変異株エシリヒア・コリ *AT2457* を形質転換したところ、約 10^5 細胞/ μ g DNA の頻度で前記選択培地上に形質転換株を得た。これにより、上記 (B) 項で調製したプラスミド *pUC119-MJg1yA* の大きさ約 2. 1 kb の *Bam*H I - *Sma* I DNA 断片上にセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれることが確認された。

【0027】(D) セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定
上記実施例1の(C)項でセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼが含まれることが確認された大きさ約 2. 1 kb の DNA 断片の塩基配列を下記の操作により決定し、この DNA 断片上に存在するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子の存在部位を特定した。

【0028】大きさ約 2. 1 kb の DNA 断片溶液 14μ l を制限酵素 *Sau3A* I を用いて 37°C で 1~5 分間処理して DNA 断片を部分分解した。また、クローニングベクター *pUC118* (宝酒造製) を制限酵素 *Bam*H I で切断した。得られたベクター DNA 断片と部分分解 DNA 断片とを混合し、この混合液にそれぞれ最終濃度が 50 mM トリス緩衝液 (pH 7. 6)、 10 mM ジチオスレイトール、 1 mM ATP、 10 mM Mg C₁₂、および T4 DNA リガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、ベクター DNA 断片と部分分解 DNA 断片とを結合させた。

【0029】上記と同様に大きさ約 2. 1 kb の DNA 断片溶液 14μ l を制限酵素 *Taq* I 50 unit と 5~8 分間反応させて部分分解 DNA 断片を調製した。クローニングベクター *pUC118* を制限酵素 *Acc* I で切断した後、これを上記と同様にして部分分解 DNA と結合させた。

【0030】得られたプラスミド混液を用い、常法 [J. Mol. Biol.、53、159(1970) 参照] によりエシリヒア・コリ *JM109* 株 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリンを $50 \mu\text{g}$ 含む前記の L 培地に塗抹した。上記培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミド DNA を用いて、ベクター *pUC118* に挿入された部分分解 DNA 断片の塩基配列をジデオキシヌクレオチド酵素法 [dideoxy chain termination method、S

anger、F. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、74、5463(1977) 参照] により決定した。

【0031】具体的には、上記培養物より抽出したプラスミド DNA をパーキン・エルマー社製カタリスト 800 モレキュラー・バイオロジー・ラボステーション (CAT ALYST 800 Molecular Biology Labostation; Perkin-Elmer) を用いてプロトコールに従い反応させた後、パーキン・エルマー社製 373A DNA シークエンサーにより各々のプラスミドの挿入 DNA 断片の塩基配列を決定した。そして、これらの個々の配列の連結は、パーキン・エルマー社製のシークエンス解析ソフト インヘリット (INHERIT) を用いて行い、大きさ約 2. 1 kb の DNA 断片の全塩基配列を決定した。その配列を後記配列表の配列番号: 1 に示す。

【0032】決定した塩基配列中にはオープンリーディングフレームの存在が認められ、既知のエシリヒア・コリの *g1yA* 遺伝子との相同性の比較により、それがプレビバクテリウム・フラバム *MJ-233* の *g1yA* 遺伝子 (塩基番号 556~1857) であることが判明した。

【0033】(E) セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ遺伝子発現ベクターの構築

上記 (B) 項で調製したプラスミド *pUC119-MJg1yA* を、制限酵素 *Bam*H I と *Sma* I で切断し、その切断断片をアガロース電気泳動に供した後、約 2. 1 kb の DNA 断片を *Gene Clean II* (フナコシ製) を用いて抽出した。得られた DNA 断片を、DNA B-lu-n-t-i-n-g-K-i-t (宝酒造製) を用いて平滑末端化処理した後、制限酵素 *Sma* I で切断した発現ベクター *pKK223-3* (ファルマシア製) と T4 DNA リガーゼにより結合させた。得られた結合 DNA 溶液を用いて常法に従ってエシリヒア・コリ *JM109* 株 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリンを $50 \mu\text{g}$ 含む前記の L 培地に塗抹した。

【0034】上記培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素 *Bam*H I および *Pst* I とで切断し、その切断断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、プラスミド *pKK223-3* の約 4. 6 kb のベクター中に、約 2. 1 kb の前記 DNA 断片が、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのオープンリーディングフレームが *pKK223-3* の *tac* プロモーターと同じ方向となるように挿入されていることが確認された。そこで、本プラスミドを *pKK223-3-MJg1yA* と命名した。得られたプラスミド *pKK223-3-MJg1yA* 溶液を、常法に従ってエシリヒア・コリ *K-12* 株 (ATCC 27325) を形質転換し、アンピシリンを $50 \mu\text{g}$ 含む前記の L 培地に塗抹した。上記培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミド DNA を抽出

し、該プラスミドを制限酵素 BamHI および PstI で切断した。その結果、本形質転換株は、pKK22-3-3-MJg1yA を含有することが確認された。そこで、本菌株をエシェリヒア・コリ K-12 SH1001 株と命名した。

【0035】(2) セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを含有する微生物の調整

MTT 培地 [組成: K_2HPO_4 7 g, KH_2PO_4 2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, アデニン塩酸塩 50 mg, 酵母エキス 1 g, トリプトン 1 g, グルコース 1.0 g, 蒸留水 1 L, pH 7.2] 500 ml を 500 ml 容三角フラスコ 4 本に分注し、120°C で 15 分間滅菌処理したものにエシェリヒア・コリ K-12 SH1001 株を植菌し、37°C にて 1 日振とう培養後、同様にして調製した MTT 培地 1.0 L を分注した 5 L 容三角フラスコ 15 本に、10 ml の培養液を接種し、37°C にて 12 時間振とう培養した。また、培養開始 3 時間後に培地中にインドールアクリル酸 100 mg を添加した。遠心分離を用いて菌体を回収し、-20°C で 2 日間凍結し保存後、以下の実験に用いた。

【0036】(3) トリプトファンシンターゼを含有する微生物の調整

MTT 培地 [組成: K_2HPO_4 7 g, KH_2PO_4 2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, アデニン塩酸塩 50 mg, 酵母エキス 1 g, トリプトン 1 g, グルコース 1.0 g, 蒸留水 1 L, pH 7.2] 500 ml を 500 ml 容三角フラスコ 4 本に分注し、120°C で 15 分間滅菌処理したものにエシェリヒア・コリ K-12 YK2009 (FERM BP-3244) 株を植菌し、37°C にて 1 日振とう培養後、同様にして調製した MTT 培地 1.0 L を分注した 5 L 容三角フラスコ 15 本に、10 ml の培養液を接種し、37°C にて 12 時間振とう培養

した。また、培養開始 3 時間後に培地中にインドールアクリル酸 100 mg を添加した。遠心分離を用いて菌体を回収し、-20°C で 2 日間凍結し保存後、以下の実験に用いた。

【0037】(4) L-トリプトファン生成反応

実施例 1 の (1) および (2) で調製したエシェリヒア・コリ K-12 SH1001 の凍結菌体 100 g およびエシェリヒア・コリ K-12 YK2009 (FERM BP-3244) 株の凍結菌体の 100 g を、インドール 0.1 g、グリシン 7.5 g、ホルマリン (ホルムアルデヒド含量 37%) 1.6 g、PLP 100 mg、THF 1.0 g、NaCl 2.3 g を含有する反応液 500 ml (pH 9.5 に 25% アンモニアで調整) に懸濁した後、全体の体積を水で 1000 ml に調整した。本懸濁液をそれぞれ 3 L ジャーファーメンター (エイブル社製) に仕込み、30°C で攪拌しながら反応を行った。反応中、反応液の pH を 25% アンモニアで 9.5 に調整した。また、反応液中のインドール濃度を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製) を用いてモニターしながらインドールの濃度が 2 mM を越えないようにインドールを連続的あるいは断続的に添加した。さらに、反応液中の L-セリン濃度を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製) を用いてモニターしながら第 1 表に示す各実験区の指定 L-セリン濃度を超えることなく L-セリン濃度を保てるようにグリシンおよびホルムアルデヒドを連続的あるいは断続的に添加し、総量として 22.5 g のグリシンを添加した。反応液中の L-トリプトファン濃度は高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製) を用いてモニターした。その結果、反応終了後の L-トリプトファンの、反応液中に添加したグリシンに対する収率 (mol%) を第 1 表に示す。

【0038】

【表 1】

第 1 表

反応液中の L-セリン濃度 L-トリプトファンの対グリシン収率

(mM)	(%)
1.0	9.5
2.0	9.6
3.0	9.5
5.0	9.5
7.0	8.5
10.0	8.0

【0039】次に、L-セリン濃度 3.0 mM で反応した反応終了液 500 ml に NaOH 水溶液を加えて pH 10 にしたのち、アンモニア型強酸性イオン交換樹脂 (ダイヤイオン SK-1B、三菱化成製) のカラムを通して L-トリプトファンの粗結晶を析出させたのち、これをアセトンで洗浄し乾燥して L-トリプトファンの結晶 16.5 g を得た。

【0040】実施例 2 セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼおよびトリプトファナーゼによる L-トリプトファン生成反応

(1) トリプトファナーゼ含有菌の調整

実施例 1 の (3) と同様にしてエシェリヒア・コリ K-12 YK3005 (FERM BP-1736) 株を培養した後、遠心分離を用いて菌体を回収し、-20

℃で2日間凍結し保存後、以下の実験に用いた。

【0041】(2) L-トリプトファン生成反応

実施例1の(2)および実施例2の(1)で調製したエシェリヒア・コリ K-12 SH1001の凍結菌体100gおよびエシェリヒア・コリ K-12 YK3005(FERM BP-1736)株の凍結菌体の100gを、インドール0.1g、グリシン7.5g、ホルマリン(ホルムアルデヒド含量37%)1.6g、PLP 100mg、THF 1.0g、KCl 3.8gを含有する反応液500ml(pH9.5に25%アンモニアで調整)に懸濁した後、全体の体積を水で1000mlに調整した。本懸濁液をそれぞれ3Lジャーファーメンター(エイブル社製)に仕込み、30℃で攪拌しながら反応を行った。反応中、反応液のpHを25%アンモニアで9.5に調整した。また、反応液中

のインドール濃度を高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製)を用いてモニターしながらインドールの濃度が2mMを越えないようにインドールを連続的あるいは断続的に添加した。さらに、反応液中のL-セリン濃度を高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製)を用いてモニターしながら第2表に示す各実験区の指定L-セリン濃度を超えることなくL-セリン濃度を保てるようグリシンおよびホルムアルデヒドを連続的あるいは断続的に添加し、総量として22.5gのグリシンを添加した。反応液中のL-トリプトファン濃度は高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製)を用いてモニターし、L-トリプトファンの対グリシン収率を求めた結果を第2表に示す。

【0042】

【表2】

第2表

反応液中のL-セリン濃度 L-トリプトファンの対グリシン収率

(mM)	(%)
1.0	9.5
2.0	9.6
3.0	9.5
5.0	9.5
7.0	8.5
10.0	8.0

【0043】L-セリン濃度30mMで反応した反応終了液500mlにNaOH水溶液を加えてpH10にしたのち、アンモニア型強酸性イオン交換樹脂(ダイヤイオンS.K-1.B.、三菱化成製)のカラムを通してL-トリプトファンの粗結晶を析出させたのち、これをアセトンで洗浄し乾燥してL-トリプトファンの結晶16.7gを得た。

【0044】

【発明の効果】本発明の製造方法により、L-トリプトファンを高効率で安価に製造することができる。

【0045】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2104

配列

GGATCCCGCG ACACCAATGA CAAACGGCAC AGAGGTGGAG GGGGAAGTTC CGAGGAAGGT
TTCCGGTGGCT GCGGTAAGTT GCTGTOGGCC CGCTACCTGG AGGTGAATCA GACGGGACAG 120
CGGAAGGTAG ACTTCTGCCA CTTCAGGGAG GTCAATGTT TCTCCGATGC CTOGAAGTTIC 180
AATGACTTCT TTTTGGGTCGA GCACCTGAGG CATTGAGTTT CTCAGCTCGC GCCATTGTGCC 240
GGGGTOGAAA TCAAGGTAGG GGCTGAAATC TGGTGTGGT GGGGAAGGTT TCACACCACT 300
TGTGCTTGCA GCGTTTGCT CTGCCATGAA TCCATTGTGC ACCTTAGCTA CTCCATTAGT 360
GTGATCGGG TTATTTTTC ACTTCAATGG GTGGCTAAAA GACGTGGGCA CGTGAGTAA 420
CTCATGCCCG CGAAACGATG GAAAGTGAACC CATACTTTA TATATGGGTA TCGGGGGTCT 480
ATGCTTGTGG GCGTACCTGT CCCGCGAGTG AGGTCTTACG CGCGGGGATTIC GTCTTGTGAA 540
AGGTTAGCTG ACCTG ATG ACC GAT GCC CAA CAC GCG GAC GAT GTC CGT TAC 591

Met Thr Asp Ala His Gln Ala Asp Val Arg Tyr

BEST AVAILABLE COPY

1	5	10	
CAG CCA CTG AAC GAG CTT GAA CCT GAG GTG GCT GCT GCC ATC GCT GGG			639
Gln Pro Leu Asn Glu Leu Glu Pro Glu Val Ala Ala Ala Ile Ala Gly			
15	20	25	
GAA CTT GCC CGT CAA CGC GAT ACA TTA GAG ATG ATC GCG TCT GAG AAC			687
Glu Leu Ala Arg Gln Arg Asp Thr Leu Glu Met Ile Ala Ser Glu Asn			
30	35	40	
TTC GTT CCC CGT TCT GTT TTG CAG GCG CAG GGT TCT GTT CTT ACC AAT			735
Phe Val Pro Arg Ser Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Val Leu Thr Asn			
45	50	55	60
AAG TAT GCC GAG GGT TAC CCT GGC CGC CGT TAC TAC GCT GGT TGC GAA			783
Lys Tyr Ala Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Tyr Tyr Gly Gly Cys Glu			
65	70	75	
CAA GTT GAC ATC ATT GAG GAT CTT GCA CGT GAT CGT GCG AAG GCT CTC			831
Gln Val Asp Ile Ile Glu Asp Leu Ala Arg Asp Arg Ala Lys Ala Leu			
80	85	90	
TTC GGT GCA GAG TTC GCC AAT GTT CAG CCT CAC TCC GGC GCG CAG GCT			879
Phe Gly Ala Glu Phe Ala Asn Val Gln Pro His Ser Gly Ala Gln Ala			
95	100	105	
AAT GCT GCT GTG CTG ATG ACT TTG GCT GAG CCA GGC GAC AAG ATC ATG			927
Asn Ala Ala Val Leu Met Thr Leu Ala Glu Pro Gly Asp Lys Ile Met			
110	115	120	
GGT CTG TCT TTG GCT CAT GGT CAC TTG ACC CAC GGA ATG AAG TTG			975
Gly Leu Ser Leu Ala His Gly Gly His Leu Thr His Gly Met Lys Leu			
125	130	135	140
AAC TTC TCC GGA AAG CTG TAC GAG GTT GTT GCG TAC GGT GTT GAT CCT			1023
Asn Phe Ser Gly Lys Leu Tyr Glu Val Val Ala Tyr Gly Val Asp Pro			
145	150	155	
GAG ACC ATG CGT GTT GAT ATG GAT CAG GTT CGT GAG ATT GCT CTG AAG			1071
Glu Thr Met Arg Val Asp Met Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Leu Lys			
160	165	170	
GAG CAG CCA AAG GTA ATT ATC GCT GGC TGG TCT GCA TAC CCT CCC CAC			1119
Glu Gln Pro Lys Val Ile Ile Ala Gly Trp Ser Ala Tyr Pro Arg His			
175	180	185	
CTT GAT TTC GAG GCT TTC CAG TCT ATT GCT GCG GAA GTT GGC GCG AAG			1167
Leu Asp Phe Glu Ala Phe Gln Ser Ile Ala Ala Glu Val Gly Ala Lys			
190	195	200	
CTG TGG GTC GAT ATG GCT CAC TTC GCT GGT CTT GTT GCT GCT GGT TTG			1215
Leu Trp Val Asp Met Ala His Phe Ala Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu			
205	210	215	220
CAC CCA AGC CCA GTT CCT TAC TCT GAT GTT GTT TCT TCC ACT GTC CAC			1263
His Pro Ser Pro Val Pro Tyr Ser Asp Val Val Ser Ser Thr Val His			
225	230	235	
AAG ACT TTG GGT GGA CCT CGT TCC GGC ATC ATT CTG GCT AAG CAG GAG			1311
Lys Thr Leu Gly Gly Pro Arg Ser Gly Ile Ile Leu Ala Lys Gln Glu			
240	245	250	
TAC GCG AAG AAG CTG AAC TCT TCC GTA TTC CCA GGT CAG CAG GGT GGT			1359
Tyr Ala Lys Lys Leu Asn Ser Ser Val Phe Pro Gly Gln Gln Gly Gly			
255	260	265	
CCT TTG ATG CAC GCA GTT GCT GCG AAG GCT ACT TCT TTG AAG ATT GCT			1407

BEST AVAILABLE COPY

Pro Leu Met His Ala Val Ala Ala Lys Ala Thr Ser Leu Lys Ile Ala			
270	275	280	
GGC AAT GAG CAG TTC CGT GAC CGT CAG GCT CGC ACG TTG GAG GGT GCT			1455
Gly Asn Glu Gln Phe Arg Asp Arg Gln Ala Arg Thr Leu Glu Gly Ala			
285	290	295	300
CGC ATT CTT GCC GAG CGT CTG ACT GCT TCT GAT GCG AAG GCC GCT GGC			1503
Arg Ile Leu Ala Glu Arg Leu Thr Ala Ser Asp Ala Lys Ala Ala Gly			
305	310	315	
GTG GAT GTC TTG ACC GGT GGC ACT GAT GTG CAC TTG GTT TTG GCT GAT			1551
Val Asp Val Leu Thr Gly Gly Thr Asp Val His Leu Val Leu Ala Asp			
320	325	330	
CTG CGT AAC TCC CAG ATG GAT GGC CAA CAG CGC GAA GAT CTG CTG CAC			1599
Leu Arg Asn Ser Gln Met Asp Gly Gln Gln Ala Glu Asp Leu Leu His			
335	340	345	
GAG GTT GGT ATC ACT GTG AAC CGT AAC GCG GTT CCT TTC GAT CCT CGT			1647
Glu Val Gly Ile Thr Val Asn Arg Asn Ala Val Pro Phe Asp Pro Arg			
350	355	360	
CCA CCA ATG GTT ACT TCT GGT CTG CGT ATT GGT ACT CCT GCG CTG GCT			1695
Pro Pro Met Val Thr Ser Gly Leu Arg Ile Gly Thr Pro Ala Leu Ala			
365	370	375	380
ACC CGT GGT TTC GAT ATT CCT GCA TTC ACT GAG GTT GCA GAC ATC ATC			1743
Thr Arg Gly Phe Asp Ile Pro Ala Phe Thr Glu Val Ala Asp Ile Ile			
385	390	395	
GGT ACT GCT TTG GCT AAT GGT AAG TCC GCA GAC ATT GAG TCC CTG CGT			1791
Gly Thr Ala Leu Ala Asn Gly Lys Ser Ala Asp Ile Glu Ser Leu Arg			
400	405	410	
GGC CGT GTA GCA AAG CTT GCT GCA GAT TAC CCA CTG TAT GAG GGC TTG			1839
Gly Arg Val Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Pro Leu Tyr Glu Gly Leu			
415	420	425	
GAA GAC TGG ACC ATC GTC TAAGCTTTTC TTGGAGTTT CATATGTAGA			1887
Glu Asp Trp Thr Ile Val			
430	434		
AGGCATCGTC GGCTTCGGCC TGGCGGTGCT TTTCTCGTTG TTTTGTGGTT TTGTCAGAGG			1947
ATGTCATGCG CGTTTTAATT ATTGATAATT ATGATTCTTT CACGTTTAAT CTOGCCACCT			2007
ATGTGGAAGA GGTTACGGGT CAGGCCACCTG TGGTGGTGCC TAATGATCAA GAAATAGATG			2067
AGACCCCTTT CGACGCCGTC ATCCCTCTCAC CGGGCCCC			2104

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
C 1 2 R 1:19)

(72) 発明者 湯川 英明
茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号
三菱化学株式会社筑波総合研究所内